

1. ПРОБЛЕМИ БІОБЕЗПЕКИ ТА БІОЗАХИСТУ. ЕМЕРДЖЕНТНІ ІНФЕКЦІЇ

УДК 619:616.98-036.22:578.832.1А:598.2(477)

DOI [10.36016/VM-2023-109-1](https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-1)

ЦИРКУЛЯЦІЯ НЕТИПОВИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ГРИПУ ПІДТИПУ Н13 СЕРЕД ДИКИХ ВОДОПЛАВНИХ ПТАХІВ

Ткаченко С. В., Стегній Б. Т., Рула О. М., Музика Д. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: semen270181@gmail.com

Екологія, епідеміологія та еволюція вірусів грипу птиці А серед диких птахів до цього часу погано вивчені через надзвичайну складність, спричинену численними видами-господарями вірусу, які важко вивчати протягом річного циклу розвитку господарів і можливе їх інфікування декількома підтипами вірусу. Ключовою складовою є розуміння генетичних зв'язків окремих підтипів вірусів грипу птиці, що дає змогу відслідкувати походження нових ізолятів або зміну причин їхньої патогенності. Метою наших досліджень стало вивчення циркуляції вірусів грипу деяких підтипів у нетипових хазяїв, проведення досліджень їхньої генетичної структури та пошук споріднених вірусів для визначення можливого походження українських ізолятів. За результатами досліджень виділено ізолят вірусу грипу птиці з підтипом гемаглютиніну Н13 від нетипових хазяїв для цього підтипу — представників ряду *Anseriformes* (галагаз, *Tadorna tadorna*). У результаті проведення філогенетичного аналізу за фрагментами ділянок генів гемаглютиніну та нейрамінідази доведено їхню подібність до ізолятів, виділених від мартинів звичайних на території Нідерландів відповідно на 97,8 і 98,24 % і далі за зменшенням ступеня гомології.

Ключові слова: вірусосоєність, гемаглютинін, нейрамінідаза

На сьогодні існує чотири варіанти вірусу грипу: типи А, В, С і D. Віруси грипу (ВГ) типу А є причиною всіх відомих великих епідемій і пандемій, хоча деякі легкі епідемії вірусу грипу типу В також були описані [1–4]. ВГ типу А поділяють на підтипи відповідно до їхніх двох поверхневих глікопротеїнів: гемаглютиніну (Н) та нейрамінідази (N) [5, 6]. Щодо глікопротеїну Н, виділено 18 функціональних антигенних підтипів (від Н1 до Н18). Для N наразі нараховується 12 функціональних антигенних підтипів [7–9]. Більшість з можливих комбінацій (144 варіанти реасортації) вірусів грипу з підтипами Н (за винятком Н17 та Н18, які циркулюють серед рукокрилих) і нейрамінідази N1–N10 (окрім N11 і N12, які також ізольовані тільки від рукокрилих — відповідно ізоляти Н17N11 і Н18N12), виділено саме від птахів [5, 10]. Також ВГ типу А має здатність інфікувати широкий спектр видів, включаючи багатьох тварин і людей [5].

На сьогоднішній день лише віруси грипу трьох підтипів за гемаглютиніном пристосувалися до того, щоб спричиняти пандемії у людей: Н1 (Н1N1) у 1918 році та останнім часом у 2009 році, Н2 (Н2N2) — у 1957 році та Н3 (Н3N2) — у 1968 році [11]. Інші підтипи (наприклад, Н5N1, Н6N1, Н7N2, Н7N7 і Н9N2) спричиняли епізоотії серед домашньої птиці в деяких регіонах світу [12].

Загалом багато вчених зосереджуються на високопатогенному вірусі Н5N1 і деяких інших, але менше уваги приділяють іншим пташиним ВГ (наприклад, Н13), які зазвичай ізолюють від багатьох видів мартинів та інших берегових птахів ряду *Charadriiformes* [13]. Вірус підтипу Н13 (Н13N6) уперше був виділений у 1977 році саме від мартинів у Сполучених Штатах [14] і згодом виявлявся переважно у мартинів і берегових птахів як вірус з низькою патогенністю [15].

Мета роботи полягала у вивченні циркуляції вірусу грипу підтипу Н13 у нехарактерних хазяїв. Також досліджували походження та генетичні зв'язки ВГП підтипу Н13, якій був виділений під час проведення епізоотичного моніторингу на території Генічеського, Новотроїцького та Чаплинського районів Херсонської області у 2016 році від галагаза (*Tadorna tadorna*) — представника ряду *Anseriformes*.

Матеріали і методи досліджень. *Збір матеріалу.* Збір проб фекалій проводили в місцях скупчення дикої птиці. Зразки фекалій поміщали до кріопробірки з транспортним середовищем з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну, які, у свою чергу — до кріобіологічного посуду з рідким азотом ($t = 196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Усі зразки з біологічним матеріалом (кріопробірки) мали відповідне маркування, де було зазначено: вид птиці, місце відбору, чергове число проби, дата відбору та назва зразка (фекалії).

Вірусологічні дослідження отриманих проб з метою ізоляції гемаглютинуючих вірусів проводили згідно з вимогами Всесвітньої організації здоров'я тварин (ВОЗТ) на курячих ембріонах 9–10-добової інкубації.

Овоскопування інфікованих ембріонів проводили двічі на добу. Час загибелі кожного ембріона реєстрували у відповідному протоколі.

Ідентифікацію проводили згідно з рекомендаціями ВОЗТ за допомогою реакції затримки гемаглютинації з використанням референтних до вірусів грипу підтипів H1–H16 і пташиних авуловірусів (aAVV) 1–4-го та 6–9-го серотипів сироваток (виробництва Veterinary Laboratories Agency (м. Вейбридж, Велика Британія), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (м. Венеція, Італія) та ННЦ «ІЕКВМ» (м. Харків, Україна).

Секвенування. Проводили секвенування та філогенетичний аналіз фрагментів генів H та NA. Секвенування проводили за допомогою комерційного набору «ABI Prism Terminator Kit» (Applied Biosystems, США) з використанням генетичного аналізатора ABI-3000 DNA (ABI Prism, США). Отриману генетичну послідовність конструювали і аналізували за допомогою програмного пакету DNASTar LaserGene (DNASTar Inc., США).

Вирівнювання генів H та N досліджуваних ізолятів разом із 100 гомологічними послідовностями, опублікованими в базі даних GenBank, проводили за допомогою відкритого програмного забезпечення MAFFT. Філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей здійснювали за допомогою програми Mega 11 методом Neighbor Joining за бутстреп-підтримки 1000. Вивчення відсотку спорідненості проводили також за допомогою програми Mega 11.

Результати досліджень. Під час проведення дослідження вірусологічного матеріалу від галагазів виявлено наявність гемаглютинуючого ізоляту, який за проведення серологічної ідентифікації затримував специфічну аглютинацію з референтною сироваткою до ВГП підтипу H13. Результати нуклеотидного секвенування дозволили встановити 6-й підтип нейрамінідази. Таким чином, вірусосойство серед галагазів щодо ВГП H13 у листопаді 2016 року на території досліджуваних регіонів Херсонської області становило 0,53 %.

У результаті проведення філогенетичного аналізу за фрагментом гена H встановлено, що український ізолят H13N6 є найбільше подібним до ізолятів H13N6, виділених в Нідерландах від мартинів звичайних (*Larus ridibundus*). Так, спорідненість з ними коливалася від 97,8 % (ізолят A/black-headed gull/Netherlands/5/2014), 97,75 % (5 ізолятів від мартинів звичайних, виділених також в 2014 році) і далі за зниженням гомології (ще 83 ізоляти). Щодо інших представників ряду Charadriiformes, український ізолят мав подібність на 96,71 % з грузинським ізолятом від мартина жовтоногого (*Larus cachinnans*), на 96,7 % — до фрагмента гена вірусу грипу H13N8, ізольованого в США на території штату Масачусетс від мартина делаверського (*Larus delawarensis*) та на 96,42 % — до фрагмента гена від мартина мартина беренгійського (*Larus glaucescens*), виділеного на Алясці. Щодо ВГП H13, виділених від птахів іншого ряду (а таких виявилось лише 2 ізоляти зі 100), на 95,78 % встановлено подібність фрагмента гена H до качиноного ізоляту, виділеного на території Китаю в 2017 році та на 95,55 % — до ізоляту, виділеного від крижня на території Нідерландів ще у 2006 році (рис. 1).

Наступним етапом наших досліджень було встановлення спорідненості українського ізоляту з іншими за фрагментом гена N (рис. 2). Так, виявлено, що зазначений фрагмент гена ізоляту A/галагаз/Україна/КТ/9-2-11/2016 на 98,24 % тотожний з геном двох нідерландських ізолятів того самого підтипу від мартинів звичайних, виділених у 2012 році. Також спостерігається спорідненість з ізолятом від мартина жовтоногого, виділеного на території Грузії — 98,23 %. Необхідно зауважити, що зі 100 ізолятів, які мають спорідненість за фрагментом гена N від 89,15 до 98,24 %, 5 вірусів виділено не від представників ряду Charadriiformes: 2 — від качок на території Сибіру, по 1 ізоляту — від качок з території Аляски (США) та префектури Хоккайдо (Японія), 1 — від крижня на території Китаю.

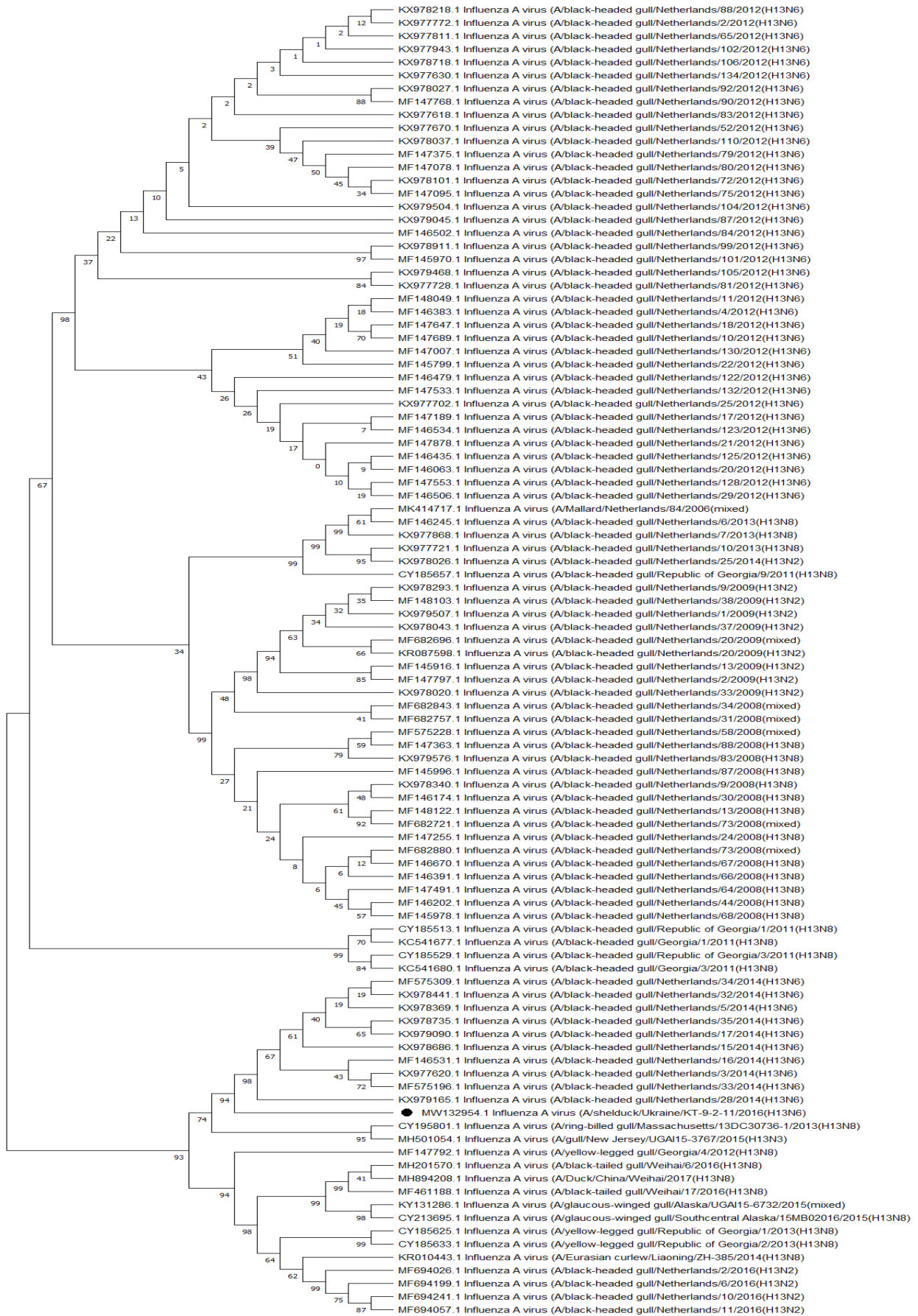


Рис. 1. Філогенетичні зв'язки ВГП A/shelduck/Ukraine/KT/9-2-11/2016 за фрагментом гена гемаглютиніну.



Рис. 2. Філогенетичні зв'язки ВГП A/shelduck/Ukraine/KT/9-2-11/2016 за фрагментом гена нейрамінідази.

Обговорення. У цій статті наведено результати вивчення вірусоносійства ВГП підтипу H13 серед нетипових представників — водоплавних птахів ряду *Anseriformes*. Нам вдалося ізолювати ВГП від галагазів (*Tadorna tadorna*) під час проведення епізоотичного моніторингу на території Генічеського, Новотроїцького та Чаплинського районів Херсонської області у 2016 році.

Вивчення генетичної спорідненості ізолюваного вірусу за фрагментом гена N показало, що український ізолят має нідерландське походження або здобув більшість своїх генів за реасортації нідерландських ізолятів. Найвища генетична спорідненість на рівні 97,8 % виявилася з вірусом A/black-headed gull/Netherlands/5/14, виділеним у 2014 році. Далі за зниженням генетичної спорідненості виявилось ще 83 ізоляти від мартинів звичайних, які мають також нідерландське походження. Що стосується ізолятів ВГП H13, що були виділені від інших представників ряду *Charadriiformes*, фрагмент гена N українського ізоляту мав подібність на 96,71 % до фрагмента гена грузинського ізоляту від мартина жовтоногого (*Larus cachinnans*), на 96,7 % — до фрагменту гена N вірусу грипу H13N8, ізолюваного в США на території штату Масачусетс від мартина делаверського (*Larus delawarensis*) та на 96,42 % — до фрагмента гена N мартина беренгійського (*Larus glaucescens*), виділеного на Алясці (США). Що стосується ізолятів від птахів інших рядів (це лише 2 ізоляти зі 100), подібність за фрагментом гена N український ізолят на рівні 95,78 % виявив з ізолятом A/Duck/China/Weihai/2017 (H13N8), виділеним на території Китаю в 2017 році від качки. Також гомологія за цим фрагментом гена на рівні 95,55 % виявлено з ізолятом A/Mallard/Netherlands/84/2006 (mixed), виділеним від крижня на території Нідерландів ще у 2006 році.

Вивчення генетичної спорідненості ізолюваного вірусу за фрагментом гена N також довело подібність українського ізоляту до нідерландських ізолятів: тотожність на рівні 98,24 % виявлено з двома ізолятами A/black-headed gull/Netherlands/70/2012 (H13N6) та A/black-headed gull/Netherlands/88/2012 (H13N6). Також спорідненість на рівні 98,23 % виявлено з грузинським ізолятом від мартина жовтоногого A/yellow-legged gull/Republic of Georgia/1/2011 (H13N6)). Зазначаємо, що зі 100 ізолятів з найбільшою спорідненістю за фрагментом гена N лише 5 виділено не від представників ряду *Charadriiformes*: 2 — від качок на території Сибіру ще в 1998 році (A/duck/Siberia/272PF/1998 (H13N6) та A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) гомологія на рівні 93,74 та 93,73 % відповідно), по 1 ізоляту — від качок з території Аляски (США) (A/duck/Interior Alaska/11PG00703/2011 (mixed)) з гомологією до фрагмента гена N українського ізоляту на рівні 91,06 %) та префектури Хоккайдо (Японія) (A/duck/Hokkaido/W189/2006 (H13N6) з гомологією до фрагмента гена N українського ізоляту на рівні 92,54 %) та 1 — від крижня, виділеного на території Китаю (A/mallard/Dalian/DZ-137/2013 (H13N6)) з гомологією до фрагмента гена українського ізоляту на рівні 91,10 %.

Висновки. Таким чином, за отриманими результатами проведених досліджень можна припустити, що український ізолят має нідерландське походження або здобув більшість своїх генів за реасортації саме нідерландських ізолятів. Отримані дані щодо вивчення спорідненості до інших ізолятів ВГП H13 за фрагментами генів N та N ще раз підтверджує той факт, що представники ряду *Charadriiformes* є основним резервуаром для цього підтипу ВГП, а ізоляція вірусу від птахів, що належать до інших рядів, є майже унікальним випадком. Ізоляція ВГП H13 від нетипових хазяїв доводить потенційну можливість цього вірусу долати бар'єр та інфікувати представників, для яких цей підтип не є характерним.

Список літератури

1. Frank A. L. et al. Influenza B virus infections in the community and the family. The epidemics of 1976–1977 and 1979–1980 in Houston, Texas. *American Journal of Epidemiology*. 1983. Vol. 118, No. 3. P. 313–325. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113638>.
2. Gao G. F., Sun Y. It is not just AIV: From avian to swine-origin influenza virus. *Science China. Life Sciences*. 2010. Vol. 53. P. 151–153. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0017-4>.
3. Guan Y. et al. The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein Cell*. 2010. Vol. 1, No. 1. P. 9–13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0008-z>.
4. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009. Vol. 459. P. 931–939. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08157>.
5. Webster R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992. Vol. 56, P. 9152–179. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>.
6. WHO. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*. 1980. Vol. 58. P. 585–591. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc2395936/>.

7. Gamblin S. J., Skehel J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. Vol. 285. P. 28403–28409. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.129809>.
8. Tong S. et al. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 10. P. 4269–4274. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116200109>.
9. Russell R. J. et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature*. 2006. Vol. 443, No. 7. P. 107 45–49. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05114>.
10. Olsen B. et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006. Vol. 312, No. 5772. P. 384–388. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1122438>.
11. Medina R. A., García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews. Microbiology*. 2011. Vol. 9. P. 590–603. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>.
12. Brown I. H. Summary of Avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006–2009. *Avian Diseases*. 2010. Vol. 54. P. 187–193. DOI: <https://doi.org/10.1637/8949-053109-reg.1>.
13. Velarde R. et al. Avian influenza virus H13 circulating in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) in southern Ontario, Canada. *Avian Diseases*. 2010. Vol. 54. P. 411–419. DOI: <https://doi.org/10.1637/8808-040109-Reg.1>.
14. Hinshaw V. S. et al. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *Journal of Virology*. 1982. Vol. 42. P. 865–872. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.42.3.865-872.1982>.
15. Höfle U. et al. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Avian Pathology*. 2012. Vol. 41. P. 547–553. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.744447>.

CIRCULATION OF ABNORMAL ISOLATES OF H13 SUBTYPE INFLUENZA VIRUS AMONG WILD WATER BIRDS

Tkachenko S. V., Stegnyy B. T., Rula O. M., Muzyka D. V.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

*The ecology, epidemiology and evolution of avian influenza A viruses in wild birds is still poorly understood due to the extreme complexity caused by the multiple host species of the virus, which are difficult to study during the annual cycle of host development and possible infection by several virus subtypes. A key component is understanding the genetic relationships of individual avian influenza subtypes, which makes it possible to track the origin of new isolates or changes in the causes of their pathogenicity. The purpose of our research was to study the circulation of avian influenza subtypes atypical for wild waterfowl, conduct research into their genetic structure, and search for related viruses to determine the origin of Ukrainian isolates. According to the results of the research, an isolate of avian influenza A with hemagglutinin H13 subtype was isolated from atypical hosts for this species — representatives of the order Anseriformes (the common shelduck, *Tadorna tadorna*). When conducting a phylogenetic analysis of the regions of the hemagglutinin and neuraminidase genes, their similarity to the isolates isolated from common martins in the Netherlands was proven to be 97.8% and 98.24%, respectively, and further down the degree of homology.*

Keywords: virus carrying, hemagglutinin, neuraminidase